

Aus dem Pathologischen Institut der
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

**VERGLEICHENDE ZYTOPHOTOMETRISCHE
BESTIMMUNG DER FARBSTOFFBINDUNGS-
KAPAZITÄT DES CHROMATINS NATIVER
LEBERZELLKERNE VON MEERSCHWEINCHEN
FÜR ACRIDINORANGE UND
PHENANTHRENCHINON IN ABHÄNGIGKEIT
VOM LEBENSALTER**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Klaus Döderlein
aus Kaiserslautern

Mainz 1974

Aus dem Pathologischen Institut der Johannes-Gutenberg-
Universität Mainz.

Vergleichende zytophotometrische Bestimmung der Farbstoffbindungskapazität des Chromatins nativer Leberzellkerne von Meerschweinchen für Acridinorange und Phenanthrenchinon in Abhängigkeit vom Lebensalter.

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Klaus D ö d e r l e i n
aus Kaiserslautern

Mainz 1974



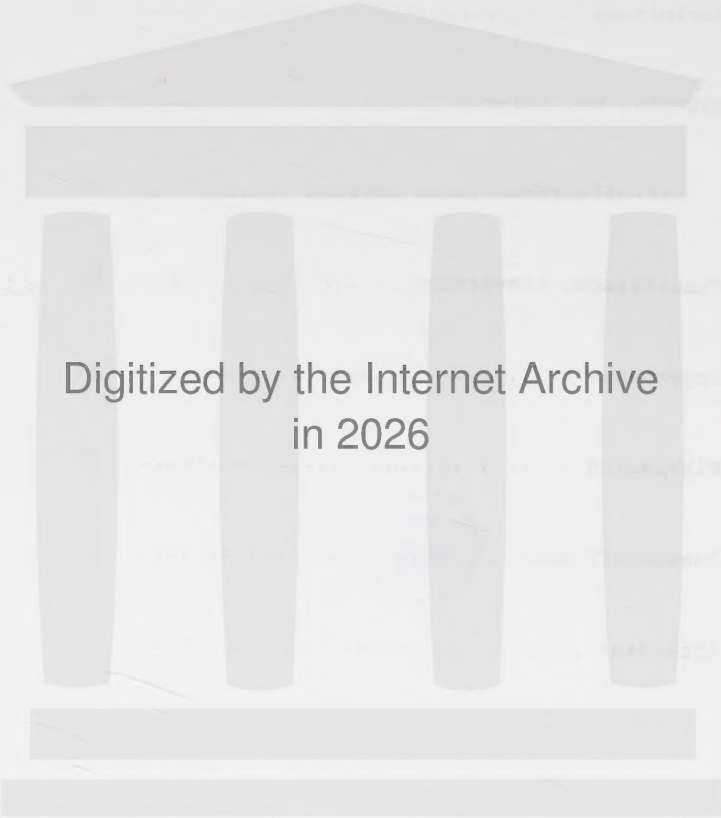
Fachbereichsdekan: Professor Dr. R. W o l f

Referent : Professor Dr. H. B r e d t

Korreferent : Professor Dr. J. L ö h r

Inhaltsverzeichnis:

Einleitung	1
Material und Methode	6
Mikrofluorometrische Messung	10
Statistische Auswertung	12
Ergebnisse	15
Diskussion	27
Zusammenfassung	37
Literatur	39



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Kinderzeit

Meinen Eltern

Einleitung:

Die Kenntnis von der Struktur und der Funktion der Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde durch die Aufdeckung des helikalen Aufbaus des doppelsträngigen DNA-Moleküls von WATSON und CRICK (1953) und die Entschlüsselung des "genetischen Kodes" durch NIERENBERG und MATTAEI (1961) wesentlich erweitert.

Nach dem von WATSON und CRICK (1953) erarbeiteten Strukturmodell der DNA handelt es sich um zwei parallel verlaufende Polynukleotidstränge, welche nach dem Prinzip der Basenpaarung über Wasserstoffbrücken aneinander fixiert sind. In sich verdreht, stellt sie eine doppelsträngige Helix (Doppelhelix) dar, wobei die Basenpaare jeweils in einer Ebene senkrecht zur Helixachse angeordnet sind, während die Zucker-Phosphatkette die äußere Schraubenlinie bildet.

Die DNA liegt im Zellkern nicht in isolierter Form vor, sondern verbindet sich mit nukleären Proteinen als DNA-Proteinkomplex (DNA-P) zu einer Funktionseinheit.

In der nukleären, chromosomal geordneten DNA ist die Information verankert, die zur Synthese der alle biologischen Prozesse kontrollierenden Enzyme abrufbar ist (GURDON und UEHLINGER 1966). Damit erlangt die DNA eine zentrale Kontrollstellung über alle Stoffwechselvorgänge in der Zelle.

Jede ausdifferenzierte Somazelle enthält in ihren diploiden oder eventuell polyploiden Chromosomensätzen die für den Gesamtorganismus notwendige Information (GURDON und LASKY 1970).

Von der genetischen Grundmatrix sind aber nur bestimmte Anteile ständig für Syntheseaufträge verfügbar, während die überwiegende Mehrzahl der Genanteile funktionell ausgeschaltet sind. Biochemische und autoradiographische Untersuchungen belegen, daß die Weitergabe des genetischen Codes nur auf die limitierten, "aktiven" Abschnitte des WATSON-CRICK Moleküls beschränkt bleibt, welche zur speziellen Syntheseleistung benötigt werden (JACOB und MONOD 1961).

Die Frage nach den Mechanismen, welche den Informationsfluß des Gens steuern, konnte bislang nicht eindeutig beantwortet werden. JACOB und MONOD (1961) postulieren in dem von ihnen, an Defektmutanten von *E. coli* erarbeiteten "Operonmodell" einen "Repressor", der durch die Blockade bestimmter Genanteile in den Regulationsmechanismus eingreift.

Die Suche nach möglichen Repressorsubstanzen ergab, daß präparativ gewonnene Nukleohistone in vitro einen ausgeprägten suppressiven Effekt auf die Matrizenwirksamkeit der DNA zeigten. Diese Tatsache führt zu der Vorstellung, daß die Histone auch in vivo eine Rolle als Repressoren verschiedener Suppressionsgrade spielen könnten (HUANG

und BONNER 1962, ALLFREY und Mitarbeiter 1963, BONNER und Ts'O 1963, v.HAHN 1963, HUANG und Mitarbeiter 1964, BUTLER 1965, RIS 1967, HABERS und Mitarbeiter 1968). Nur ein fein abgestimmtes Gleichgewicht der nukleären Regulatoren garantiert eine optimale Zellfunktion (HOLGER und v.HAHN 1966). Mit steigendem Alter wird bei Mensch und Tier eine verminderte Adaptationsfähigkeit der Zelle an äußere und innere Reize beobachtet. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise in differenzierten strukturellen Veränderungen des DNP-Komplexes (COMFORD 1968, v.HAHN 1971). Morphologisches Zeichen einer altersabhängigen Chromatinveränderung ist die zunehmende, vermutlich irreversible, Heterochromatinisierung (HABERS und SANDRITTER 1968, DENKHAUS und Mitarbeiter 1969, SANDRITTER und Mitarbeiter 1970, BENEKE und Mitarbeiter 1971). Als Heterochromatin werden kondensierte Chromosomenabschnitte bezeichnet, die im Interphasenzellkern als Chromozentren auftreten und färberisch gut darstellbar sind. Sie repräsentieren funktionell ausgeschaltete Informationsanteile der DNA und können als negative Gradmesser genetischer Aktivität angesehen werden (HABERS 1969, HABERS und SANDRITTER 1973). Ein biochemisch faßbares Korrelat für das Phänomen der Heterochromatinisierung findet sich in den Arbeiten von v.HAHN und VERZAR 1963, v.HAHN 1964/65 a, b und v.HAHN und FRITZ 1966. Sie konnten mit unterschiedlichen biochemischen Methoden

eine mit steigendem Alter des untersuchten Materials (z. B. Rinderthymus-DNP) zunehmende Verfestigung des DNP-Komplexes nachweisen. Demnach scheint sich alterndes Chromatin durch eine strukturelle Stabilisierung des DNA-Helix als Folge einer verstärkten Proteinanheftung auszuzeichnen (v.HAHN 1965).

Wenn auch der makromolekuläre Aufbau des DNP-Komplexes bisher weitgehend ungeklärt ist, so gilt als sicher, daß die Anlagerung basischer Kernproteine an die DNA, insbesondere die der argininreichen Histone, über deren Phosphatseitenketten erfolgt (VENDRELY und VENDRELY 1953, BLOCH 1962, ALLFREY und Mitarbeiter 1963, AKINRIMISI und Mitarbeiter 1965, FREDERIQ 1971).

Darüber hinaus scheint diesen DNA-PO₄-Gruppen bei der Transskriptionskontrolle eine besondere Funktion zuzukommen (FRENSTER 1965 a, b, HUANG 1969).

Als eine spezifische Methode zur Erfassung dieser Reaktionszentren bietet sich die - von RIGLER (1966) inaugurierte - Acridinorangefärbung an. Parallel hierzu gelingt mit dem Farbstoff Phenanthrenchinon die Darstellung von Guanidinogruppen nukleärer Argininresiduen (MAGUN und KELLY 1969), die als Bestandteil basischer Kernproteine den DNA-PO₄-Gruppen möglicherweise als Bindungspartner dienen.

Die altersabhängige Verfestigung des DNP-Komplexes - durch v.HAHN (1965) als Resultat verstärkter Proteinein- oder Anlagerung am Polynukleotidstrang erklärt - müßte

eine Differenz der Farbstoffbindungskapazitäten für Acridinorange und Phenanthrenchinon zwischen jungen und alten Tieren zur Folge haben.

Daher sollte, auf den Arbeiten von DENKHAUS und HEIMER (1970) und HEIMER (1972) aufbauend, in der vorliegenden Arbeit die individuelle Farbstoffbindungskapazität sogenannter "freier" DNA-Phosphatgruppen und parallel hierzu das Farbstoffbindungsvermögen nukleärer Argininresiduen an Leberzellkernen von Meerschweinchen verschiedener Altersklassen untersucht werden.

Material und Methode:

Wir untersuchten Leberzellkerne von insgesamt 35 weiblichen Meerschweinchen. Zuchtstamm: Pirbright Albinos (The Animal Virus Research Institute, Woking, Surrey, England). Die von einem Tier entnommenen Leberpräparate wurden für zwei getrennte Färbungen (Acridinorange und Phenanthrenchinon) aufbereitet. Pro Tier wurden 2 x 3 Präparate angefertigt.

Die Untersuchungen wurden auf fünf, unter gleichen Versuchsbedingungen vorgenommenen Färbeserien verteilt. Für jede Versuchsreihe lag die gleiche Anzahl von Tieren vor. Es wurde jeweils eine einheitliche Altersgruppierung ausgewählt: Neugeborene (max. 10 Tage), 6, 18, 24, 30, 36, 48 Monate. Bei allen Tieren handelte es sich um weibliche Meerschweinchen. Trächtige Tiere wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen.

Tötung der Tiere durch Dekapitation und nachfolgender Ausblutung. Entnahme der Leber unter Schonung der Gallenblase. Einschnitt in den linken Leberlappen, Entnahme von Lebergewebe mit geschliffenem Objektträger. Quetschung der Gewebprobe zwischen zwei gereinigten Objektträgern, Ausstrich mit der Kante eines Objektträgers auf einem zweiten, fluoreszenzfreien (Firma Kindler, Freiburg i.Br.). Auf diese Weise wurden pro Tier 2 x 3 Ausstriche angefertigt.

Färbungen:

1. Acridinorange:

Vorbereitung:

1 Std. Lufttrocknung bei Raumtemperatur. Bis zur Färbung Aufbewahrung im Kühlschrank bei -6°C über Silikagel. Färbegänge im Wasserbad bei $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ in Glasküvetten (100 ml Inhalt). Die Objektträger wurden senkrecht in die Küvetten eingebracht; die Reihenfolge der Altersklassen war zufällig. Alle Präparate eines Färbeganges wurden in derselben Färbelösung und der gleichen Küvette angefärbt.

Farbstoff:

Für jeden Färbegang wurde eine ausreichende Farbstoffmenge mit einer Endkonzentration von 10^{-4} M in Zitronensäure- $\text{Na}_2\text{-HPO}_4$ -Puffer, pH 4.1, unter radiometrischer Kontrolle hergestellt.

Färbung mit Acridinorange (Fa. E. Merck, Darmstadt, D, C.I. 46005, S.Nr. 902), pH 4.1, nach Acetylierung.

Farbgänge:

1. Pyridin, wasserfrei (Fa. E. Merck, Darmstadt, D, Nr. 7461) 5 min.
2. Pyridin-Essigsäureanhydrid (Fa. E. Merck, Darmstadt, Nr. 42), Mischung 3 : 2, 15 min.
3. Äthanol 100 %, 96 %, 60 %, 30 % jeweils 5 min.
4. Aqua bidest. 3 min.
5. Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 4.1, 3 x 5 min.

Eindeckung in Zitronensäure-Phosphat-Puffer, pH 4.1, Deckglasgröße 24 x 50 mm, luftdichter Abschluß durch Umrandung mit Nagellack (Juvena, Cream 361).

2. Phenanthrenchinon:

nach MAGUN und KELLEY (1969)

Vorbereitung:

Ausstrich auf alkoholgereinigte Objektträger. Einstündige Lufttrocknung bei Raumtemperatur. Fixation der Präparate in neutral gepuffertem Formalin (24 h). Lagerung in versiegelten Küvetten (100 ml Inhalt) bei 4 C. Einstündige Wässerung (20 C).

Färbung:

Färbung in Glasküvetten (100 ml Inhalt) bei Raumtemperatur. Die Objektträger wurden senkrecht in die Küvetten eingebracht, wobei die Reihenfolge der einzelnen Präparate zufällig war. Alle Ausstriche eines Färbeganges wurden in dergleichen Farbstofflösung und dergleichen Küvette angefärbt. Für jeden Färbegang wurde ein frischer Ansatz der folgenden Färbelösung hergestellt:

a. 1 Teil 0.5 n Na(OH) (2 ml)

4 Teile Äthanol 100 % (80 ml)

Aqua bidest. (18 ml)

b. 200 mg Phenanthrenchinon (9,10-Phenanthren-
dion 98 %, F: 206-207 C; Firma Schuchard
München).

Die Lösungen (a) und (b) wurden erst zu Beginn der Färbung vermischt.

Im einzelnen wurden folgende Reaktionen ausgeführt:

1. Alkohol 70 % 5 min.
2. Alkohol abs. 100 % 5 min.
3. Xylol 5 min.
4. Alkohol abs. 100 % 3 x 1 min.
5. Phenanthrenchinon (Farbstoffansatz siehe oben)
 10 min.
8. Äthanol 100 % 3 x 1 min.
9. Äthanol 70 % 5 min.
10. Äthanol 30 % 5 min.
12. Aqua bidest. 5 min.

Eindeckung der Präparate mit einer frisch zubereiteten Lösung aus 9 Teilen Glycerin (Glycerin für Fluoreszenzmikroskopie Nr. 4094 Fa. E. Merck, Darmstadt) und 2 Teilen 5 n NaOH.

Luftdichte Abdichtung der Präparate mit Nagellack. Lagerung bis zur Auswertung (max. 12 Std.) bei +4 C.

Mikrofluorometrische Messung:

Die Mikrofluorometrischen Messungen wurden mit einem Mikroskopphotometer mit variabler Messblende vorgenommen (Firma Leitz, Wetzlar, W.-Deutschland). Aufbau im wesentlichen nach BÖHM und SPRENGER (1968).

1. Durchlicht zur Objekteinstellung:

Phasenkontrast (Kondensor nach Heine (1931)); Ölimer-sionsobjektiv PvFl 70 x, N.A. 1.15; Niedervoltlampe 5V. Die Ausbleichung wurde durch Vorschaltung eines Interferenzdoppelbandfilters 618 ± 19 nm (Firma Schott u. Gen., Mainz, W.-Deutschland) niedrig gehalten.

2. Messung in Auflichtfluoreszenz:

Optische Einrichtung: PLOEM-OPAK, Objektiv PvFl 70 x. Anregung durch Xenon-Höchstdruckbrenner XBO 150 W (Osram, Berlin, W.-Deutschland), Gleichrichter Vorschaltgerät Typ VX 150 f-2b-L, unter Vorschaltung eines Spannungskonstanthalters Typ EMK VX (Dominit); beide Geräte: Firma Siemens, Erlangen, W.-Deutschland. Wärmeschutzfilter BG 38. Erregungsfilter: UG 1, 1 mm, BG 38 1 mm; Sperrfilter: Interferenzbandverlaufsfilter Veril a, Typ B-60 (alle Filter Firma Schott u. Gen., Mainz, W.-Deutschland).

Messung: a. Acridinorange bei 530 nm

b. Phenanthrenchinon bei 490 nm.

Meßeinrichtung: S-20 Photokathode, Typ 9558 A (Firma EMI, England). Spannungsteiler Typ SKV/K BN 345 A, hochstabilisiertes Netzgerät Typ NSH M BN 600 S/N 481, zusammengefaßt in der Lichtmeßeinrichtung TYP MFLK BN 5007 (Firma Knott Elektronik, München, W.-Deutschland). Saugspannung: 1.2 kV.

Meßinstrument: Mikroamperemeter, Meßbereich: 0,0018 - 20 mA/Skalenteil (Firma Norma, Wien, Österreich); eingestellt auf 0.002 mA/Skalenteil.

3. Meßvorgang:

Die Zellkerne wurden bei 618 nm im Phasenkontrast eingestellt. Ausblendung des Durchlichtes; Öffnung des Photomultipliierverschlusses. Einstellung des Interferenzbandverlauffilters a) bei der Acridinorangefärbung auf 530 nm, b) bei der Phenanthrenchinonfärbung auf 490 nm.

Einblendung des Ultraviolettlichtes. Ablesung der Meßanzeige. Ermittlung des Leerwertes in umgekehrter Reihenfolge, wobei direkt neben dem Zellkern gemessen wurde.

Statistische Auswertung:

Das Untersuchungsmaterial wurde von insgesamt 35 Tieren gewonnen, die auf fünf Versuchsserien mit jeweils gleicher Altersgruppierung verteilt waren.

Zur statistischen Auswertung lagen die Ergebnisse aus 120 Einzelmessungen pro Tier und Färbung vor. Von diesen Meßwerten wurde mit Hilfe eines programmierten Rechners (Olivetti Programma 101) das arithmetische Mittel der Einzelwerte nach folgender Formel errechnet:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N}$$

Dabei stellt X_i den Wert der einzelnen Reihenglieder und N ihre Anzahl dar.

Als Maß der Streuung der Einzelwerte vom geschätzten Mittelwert wurde - gemäß nachstehender Formel - die mittlere quadratische Abweichung (Standardabweichung) bestimmt.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N}}$$

Der mittlere quadratische Fehler des Mittelwertes errechnet sich nach:

$$s_{\bar{X}} = \frac{s}{\sqrt{N}}$$

Für jedes Tier und jede Färbung wurden $\bar{X}$, s , und $s_{\bar{x}}$ aus den jeweiligen 120 Einzelmessungen ermittelt.

Soweit Meßergebnisse graphisch dargestellt wurden, ist mit $\bar{X}$ auch die zugehörige Standardabweichung s der Einzelwerte eingezeichnet.

Zur Trendverdeutlichung erschien es sinnvoll, eine Regressionsgerade zu ermitteln. Die Verteilung der Werte im Streudiagramm entsprach weitgehend einer negativen Exponentialfunktion mit asymptotischer Annäherung an die Altersachse. Um nun in der graphischen Darstellung eine plausible Anpassung der Regressionsgeraden an die Punkte des Streudiagramms zu erreichen, wählten wir die halblogarithmische Darstellung, wobei die Meßwerte in logarithmischem Maßstab und das Alter linear dargestellt wurden. Alle Logarithmen sind dekadisch. Die Regressionsgerade für die Regression der logarithmischen Emission (E) nach dem Alter (A) ist gegeben durch:

$$\begin{aligned}\bar{E}(A) &= \bar{E} + b(A - \bar{A}) \\ &= a + b \cdot A \\ \text{mit} \quad a &= \bar{E} - b \cdot \bar{A} \\ b &= \frac{\sum (E - \bar{E}) \cdot (A - \bar{A})}{\sum (A - \bar{A})^2}\end{aligned}$$

Dimensionen:

$$[E] = \log AE$$

$$[A] = m \text{ (Monate)}$$

$$[a] = \log AE$$

$$[b] = \frac{\log AE}{m}$$

Mittelwerte und Summen beziehen sich auf die jeweilige ganze Serie, nicht mehr allein auf die einzelnen Tiere.

Die allgemeine Regressionsgleichung lautet:

$$\log E(\text{Emission}) = a + b A \text{ (Alter)}$$

a stellt die Regressionskonstante und b den Regressionskoeffizienten dar.

Ergebnisse:

Die Ergebnisse unserer Messungen sind in den Tabellen I - III wiedergegeben. Wie aus Tab. I hervorgeht, liegen bei den Acridinorangefärbungen die Emissionswerte der jüngeren Tiere deutlich über denen der Älteren.

Das mittlere Fluoreszenzniveau der 48 Monate alten Individuen ist gegenüber den Neugeborenen um etwa 37 % erniedrigt. Die Werte der übrigen Altersklassen zeigen - wie in den graphischen Darstellungen (Abb. I a - e) ersichtlich - einen kontinuierlichen, altersentsprechenden Abfall.

Ein ähnliches Bild liefern die Ergebnisse der Phenanthrenchinonfärbungen (Tab. II). Von einem Fluoreszenzniveau bei etwa 100 Arbeitseinheiten (AE) der jüngsten Tiere sinkt die Emission auf Werte um 38 AE ab. Auch die Mittelwerte der dazwischenliegenden Altersklassen werden mit zunehmendem Individualalter der Tiere kleiner. Daß es sich auch hier um einen fortlaufenden Emissionsabfall handelt, zeigen die Abbildungen II a - e.

Dieser Trend wird durch den Verlauf der Regressionsgeraden verdeutlicht.

Eine Zusammenstellung der Regressionskoeffizienten (Tab. III) - als Maß für die Steigung der Regressionsgeraden - weist in allen Versuchsserien negative Werte auf.

Als Ergebnis unserer Untersuchungen zeigt sich, daß die Fluoreszenzemission bei jungen und alten Tieren - sowohl für die Acridinorangefärbung als auch für die Phenanthrenchinonfärbung - deutliche Unterschiede aufweist. Hierbei ist mit steigendem Individualalter der untersuchten Tiere ein stetiger Abfall der Fluoreszenzemission zu verzeichnen.

Im Vergleich zur Acridinorangefärbung zeigt die Phenanthrenchinonfärbung ein niedrigeres Emissionsniveau. Beide Färbungen ergeben jedoch denselben altersabhängigen Emissionsabfall.

Der allgemeine Trend der Meßwertverteilung im Koordinatensystem - bei nicht logarithmischer Darstellung - scheint am ehesten dem Bild einer negativen Exponentialfunktion zu entsprechen, mit stärkerem Emissionsabfall bei den jüngeren Tieren und asymptotischer Annäherung an einen bestimmten Grenzwert bei den älteren Individuen.

Färbung	Färbeserie	Alter der Tiere in Monaten	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$
Acridinorange	I	0,3	113,0	7,9	0,8
		6	97,6	5,6	0,5
		18	74,4	3,9	0,2
		24	63,7	2,8	0,1
		30	53,9	5,6	0,3
		36	51,0	9,0	0,8
	II	48	44,2	2,6	0,4
		0,3	117,0	9,0	0,8
		6	95,7	3,0	0,7
		18	73,2	6,4	0,8
		24	59,5	4,8	0,5
		30	53,0	4,1	0,8
	III	36	48,5	3,5	0,6
		48	44,4	5,3	0,2
		0,3	105,5	9,0	10,7
		6	89,4	3,0	0,8
		18	72,0	6,4	0,6
		24	58,9	4,8	0,7
	IV	30	51,3	4,1	0,1
		36	45,9	3,5	0,7
		48	41,0	5,3	0,3
		0,3	112,8	10,2	1,2
		6	81,9	10,3	0,9
		18	73,2	9,4	0,9
	V	24	57,5	3,6	0,6
		30	49,0	4,1	0,7
		36	50,7	2,2	0,5
		48	41,0	6,1	0,3
		0,3	110,9	7,1	0,8
		6	92,5	3,6	0,2
		18	67,1	8,3	0,5
		24	57,9	10,4	0,0
		30	47,2	7,3	0,3
		36	48,8	2,6	0,1
		48	41,0	1,8	0,1

Tab. I

Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardabweichung des Mittelwertes der Fluoreszenzemission von Meerschweinchenleberzellkernen nach Acridinorangegefärbung. AE in 0.002 mA/ Skt. bei 530 nm.

Färbung	Färbeserie	Alter der Tiere in Monaten	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
C O C C F U O B H A U C E L L E	I	0,3	100,4	2,4	0,4
		6	93,6	10,4	1,6
		18	96,7	4,5	0,5
		24	98,7	6,7	0,2
		30	99,4	4,6	0,6
		36	97,1	3,5	0,6
		48	99,1	2,7	1,1
	II	0,3	100,8	7,1	0,6
		6	91,3	2,4	0,2
		18	92,2	1,1	1,1
		24	96,1	1,1	0,6
		30	98,3	6,1	1,9
		36	99,1	4,1	1,6
		48	99,1	7,1	1,1
	III	0,3	96,7	9,1	0,7
		6	96,0	9,1	1,0
		18	97,0	9,1	0,8
		24	97,1	10,2	0,3
		30	98,1	4,1	0,7
		36	98,7	6,1	0,6
		48	99,6	1,1	1,3
	IV	0,3	100,1	1,1	1,1
		6	99,1	1,0	0,1
		18	99,4	6,0	0,4
		24	99,1	4,1	0,7
		30	99,1	1,1	0,1
		36	99,1	1,1	0,1
	V	0,3	100,1	1,1	1,1
		6	99,1	1,1	1,1
		18	99,1	1,1	1,1
		24	99,1	1,1	1,1
		30	99,1	1,1	1,1
		36	99,1	1,1	1,1

Tab. II

Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardabweichung des Mittelwertes der Fluoreszenzemission (490 nm) von Meerschweinchenleberzellkernen nach Phenanthrenchinonfärbung. AE in 0.002 mA/ Sekt.

Serie	Färbung	
	Acridinorange	Phenanthrenchinon
I	-0.0088	-0.0090
II	-0.0092	-0.0097
III	-0.0089	-0.0098
IV	-0.0087	-0.0098
V	-0.0085	-0.0098

Tab. III

Zusammenstellung der Regressionskoeffizienten b (in $\log AE/m$) der einzelnen Versuchsreihen für die Acridinorange- und Phenanthrenchinonfärbung.

Abbildungen I a - e

Mittelwerte ($\bar{X}$) und Standardabweichungen (s) der Fluoreszenzemission (530 nm) diploider Meerschweinchenleberzellkerne nach Acridinorangefärbung (ph 4.1, nach Azetylierung) mit Regressionsgeraden.

Abszisse: Lebensalter der Tiere in Monaten, linear.

Ordinate: Fluoreszenzemission in 0.002 mA pro angegebener Arbeitseinheit (AE), logarithmisch.

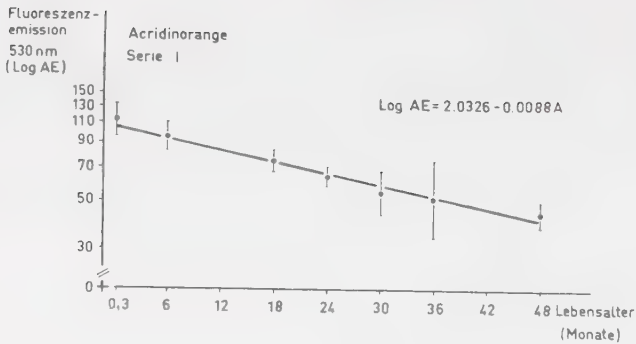


Abb. I a

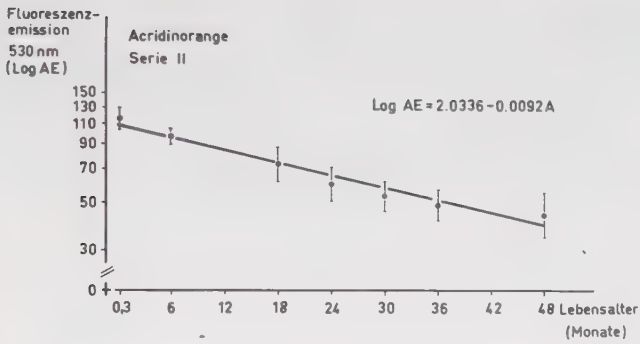


Abb. I b

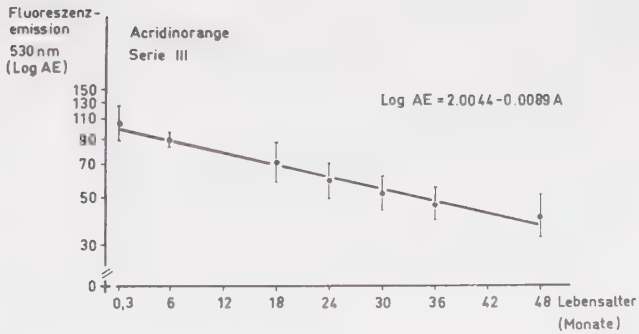


Abb. I c

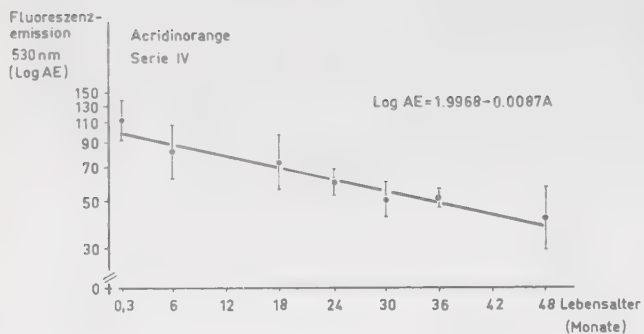


Abb. I d

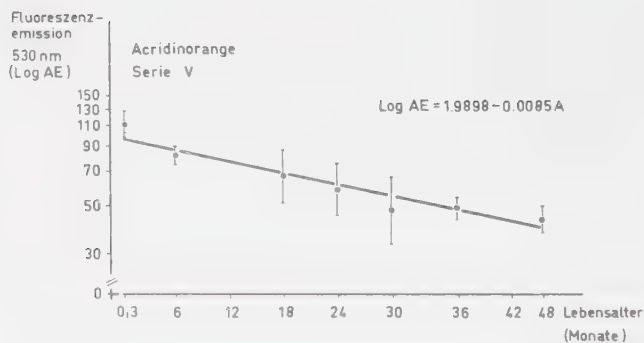


Abb. I e

Abbildungen II a - e

Mittelwerte ($\bar{X}$) und Standardabweichung (s) der Fluoreszenzemission (490 nm) diploider Meerschweinchenleberzellkerne nach Phenanthrenchinonfärbung mit Regressionsgleichung.

Abszisse: Lebensalter der Tiere in Monaten, linear.

Ordinate: Fluoreszenzemission in 0.002 mA pro angegebener Arbeitseinheit, logarithmisch.

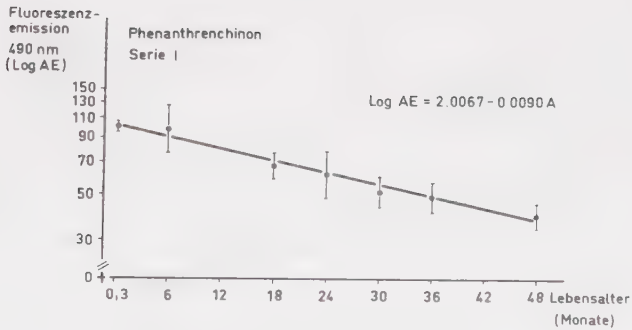


Abb. II a

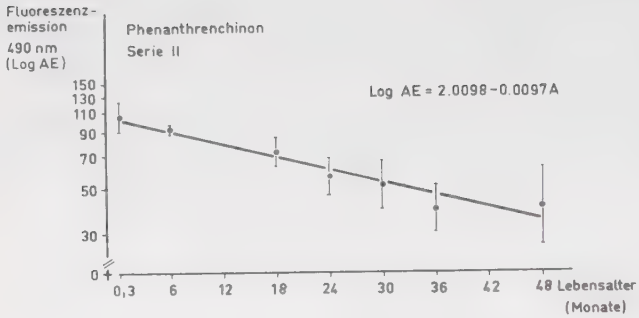


Abb. II b

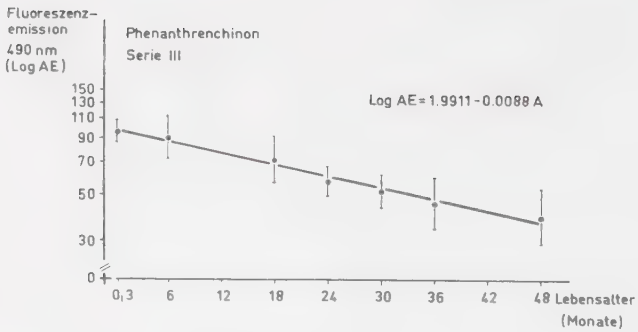


Abb. II c

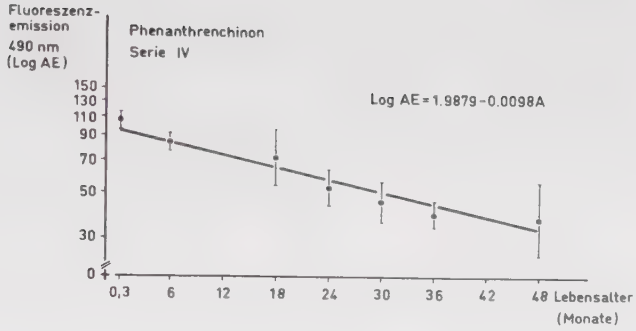


Abb. II d

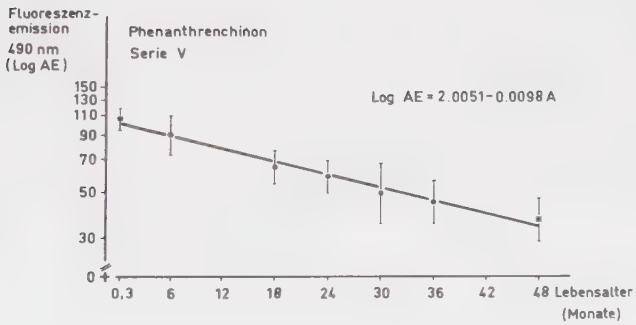
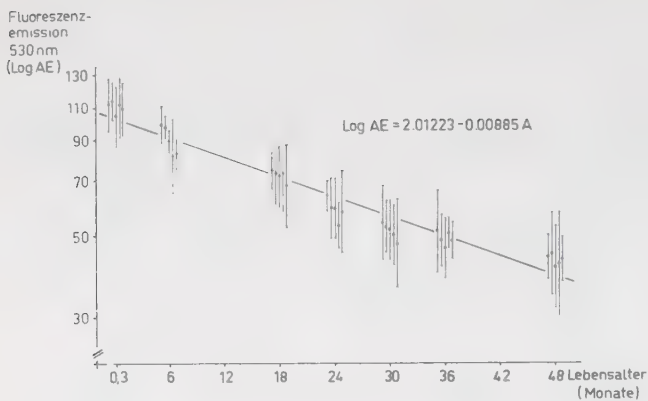
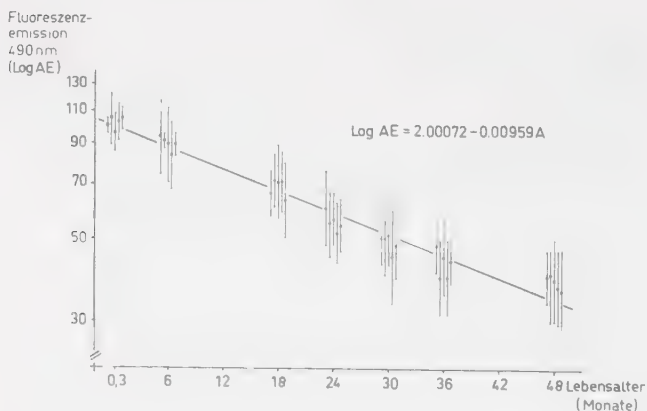


Abb. II e



Tab. III a

Zusammenfassende Darstellung der Serien I - V nach Acridinorange-färbung. Erklärung siehe im Text.



Tab. III b

Zusammenfassende Darstellung der Serien I - V nach Phenanthrenchinon-färbung. Erläuterungen siehe im Text.

Diskussion:

Man kann den Zellstoffwechsel mit einer hierarisch gegliederten Reaktionskette vergleichen, die auf dem genetischen Kode basierend, über die Transsscription und Translation zur Biosynthese spezifischer - für die Homöostase des Gesamtorganismus verantwortlicher - Proteine führt.

Eine permanente Unterbrechung eines oder mehrerer Glieder dieser Kette muß zwangsläufig eine Störung der nachgeordneten Funktionsabläufe und somit irreversible Auswirkungen sekundärer Art auf den Organismus nach sich ziehen. Derart permanente Veränderungen lebender Substanz als Funktion der Zeit kann man als Altern bezeichnen (BÜRGER 1959).

Der Stand der heutigen experimentellen Gerontologie gibt viele Hinweise, daß die Phänomene, welche wir als physiologische Alterung und pathologisches Altern kennen, ihren Ursprung auf zellulärer und molekularer Ebene haben. Diese auch als "primäres Altern" (VERZAR 1971) bezeichneten Vorgänge, deren folgenschwerstes Resultat letztlich die Verminderung des Proteinbiosynthesepotentials der Somazelle zu sein scheint (BULANKIN und Mitarbeiter 1964), spricht für grundlegende Veränderungen am primären Informationsträger der Eiweißbiosynthese, der DNA (HOLGER und v.HAHN 1966).

Qualitative und quantitative Störungen im normalen Informationsfluß der Somazelle werden von der heutigen gerontologischen Forschung (BENEKE und Mitarbeiter 1971) im wesentlichen auf folgende Mechanismen zurückgeführt:

- a. Verlust von genetischem Material.
- b. Änderungen des genetischen Kodes.
- c. Störungen im Transcriptions- und Translationsmechanismus.

Während der Mitose kann es durch Brüche und unvollständige Trennung der Chromosomen zu einem Verlust von genetisch wirksamen Material kommen. Derartige Chromosomenuntergänge konnten CURTIS (1964) und CURTIS und TILLEY (1968) in pathologischen Leberzellmitosen bei alten Ratten vermehrt nachweisen.

Eine derart eingreifende Schädigung der genetischen Matrix müßte aber zu einem sehr frühen Zelltod führen, da ein fein abgestimmtes Gleichgewicht der Gene Voraussetzung für eine normale Zellfunktion ist (HOLGER und v.HAHN 1966). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, daß der DNA-Gesamtgehalt somatischer Zellen keinen altersbedingten Schwankungen unterliegt (FALZONE und Mitarbeiter 1959, KURNICK 1962, HOLLANDER und BARROWS 1966, ENESKO 1967, DENKHAUS 1970). Vielmehr scheint der Genbestand durch das Phänomen der "DNA-Repair" konstant gehalten zu werden (SETLOW 1967). Möglicherweise existieren bestimmte genetische Kontrollmechanismen, welche die Stabilität der Chromosome überwachen (CURTIS und Mitarbeiter 1966).

Veränderungen nur bestimmter Genanteile könnten zu einer Verfälschung des genetischen Kodes und als Folge zur Biosynthese sogenannter "falscher Proteine" führen. Da die Zelle aber weiterhin teilungsfähig bleibt, kommt es mit steigendem Alter zu einer stetigen Zunahme derart falsch kodierter Gene. Diese Vorstellung erklärt den Alterungsprozeß nach der sog. "somatischen Mutation" (CURTIS und GEBHARD 1958, SZILLARD 1959, FAILLA 1960, CROWLEY und CURTIS 1963, CURTIS 1964).

WALFORD (1962) und BLUMENTHAL und BERNIS (1964) vertreten die Auffassung, daß dem Altern Autoimmunvorgänge zugrunde liegen. Die Folge spontaner "somatischer Mutation" wäre die Biosynthese von Proteinen mit veränderter Aminosäuresequenz, die - über eine Histoinkompatibilität Autoantikörper induzierend - einen fortschreitenden Zellzerfall verschuldeten.

HOLGER und v.HAHN (1966) führen den Alterungsprozeß - nicht im Widerspruch zur "Somatischen Mutationstheorie" - auf Funktionsstörungen des genetischen Regulationsmechanismus zurück.

Die Freigabe definierter Biosyntheseaufträge am DNA-Molekül unterliegt offensichtlich einer komplexen Steuerung. Denn die Transskription des genetischen Kodes für eine spezifische Proteinbiosynthese ist auf kompetente Genloci innerhalb der DNA beschränkt (JACOB und MONOD 1961). Eine Erklärung - Ergebnis umfangreicher genetischer Studien - bietet die von JACOB und MONOD (1961)

im sog. "Operonmodell" vorgetragene Modellvorstellung. Hiernach besteht in der Zelle eine dem jeweiligen Funktionszustand angepaßte Wechselwirkung zwischen "Strukturgenen" (definierte genetische Information tragende DNA-Anteile) und diesen vorgeschalteten, Funktionseinheiten koordinierenden "Operatorgenen" sowie einem "Repressor". Im Normalzustand wird das "Operon", bestehend aus Struktur- und Operatorgen, durch den Repressor blockiert. Erst die Freisetzung eines "Induktors" erlaubt die Übergabe des genetischen Kodes auf die messenger-RNA.

In Anlehnung an diese Jacob und Monod'sche Vorstellung vertreten HOLGER und v.HAHN (1966) die Auffassung, daß die Zellalterung Folge einer DNA-Blockade durch irreversible Anlagerung eines Repressors ist.

Erste biochemische Hinweise auf eine mögliche "Repressorsubstanz" erbrachten die Histone. Sie erwiesen in vitro Versuchen einen ausgeprägten suppressiven Effekt auf die Matrizenwirksamkeit aktivierter DNA (HUANG und BONNER 1962, ALLFREY und Mitarbeiter 1963, BILLEN und HNILICAS 1964). Dies ließ vermuten, daß die Histone auch in vivo suppressorisch aktiv auf die biologische Informationsübertragung wirken (BUTLER 1965). Die Vorstellung - Histone seien identisch mit dem von Jacob und Monod postulierten Repressor - blieb in ihrer vereinfachten Form nicht unwidersprochen (HABERS 1971).

Wesentliche Argumente gegen eine direkte Repressorfunktion der Histone sind ihre Strukturmonotonie, ihr träger Stoffwechsel und schließlich die Tatsache, daß das Mengenverhältnis Histone : DNA in Eu- und Heterochromatin konstant ist (HABERS 1969).

Dennoch erscheint es denkbar, daß die Proteinanteile in den Nukleohistonen zur Spezifität der Wechselwirkung zwischen Repressor und DNA beitragen (HABERS 1969).

Histone scheinen bei den altersbedingten Umbauvorgängen maßgeblich mitbeteiligt zu sein. Experimentelle Untersuchungen (v.HAHN 1965) über das Denaturierungsverhalten des Nukleohistons von jungen und alten Tieren zeigten, daß das Chromatin älterer Tiere eine höhere Temperaturstabilität aufwies als das jüngerer Individuen.

Da die thermische Denaturierung der DNA eine Aufspaltung der beiden Stränge der Doppelhelix zur Folge hat, spricht dieser Befund für eine altersabhängige Stabilisierung der Watson-Crickspirale (v.HAHN und FRITZ 1966). Dies soll das Ergebnis einer differenzierten Proteineinlagerung in den Polynukleotidstrang darstellen, mit Ausbildung stabiler Kreuzverbindungen zwischen den beiden DNA-Ketten, zumal zusätzliche intramolekulare Wasserstoffbrücken nicht möglich sind.

Ebenso spricht die unterschiedliche Feulgen-Hydrolysierbarkeit des Chromatins junger und alter Tiere (DENKHAUS und Mitarbeiter 1969) für eine physiko-chemische Altersveränderung des DNA-Proteinkomplexes, als Folge einer

im Chromatin alter Individuen "andersartigen" Proteinbindung an die DNA.

Bekräftigt wird diese Vorstellung durch Arbeiten CRUFT's (1961) sowie von v.HAHN (1964/65 a, b), die an isolierter Rinderthymus-DNA bei alten Tieren eine vermehrte, nicht dissoziablen Histonaggregation nachweisen konnten. Die Anlagerung der nukleären Proteine erfolgt vermutlich über die PO_4 -Gruppen der Zucker-Phosphatkette (HUANG und BONNER 1962, FRENSTER und Mitarbeiter 1963, HUANG 1969). Diese verkörpern daneben einen funktionell bedeutsamen Strukturbestandteil der DNA, da ihnen eine wichtige Rolle im genetischen Regulationsmechanismus zugeschrieben wird (FRENSTER 1965 a, b, HUANG 1969). Jene DNA- PO_4 -Gruppen lassen sich mit der von RIGLER (1966) inaugurierten Acridinorangefärbung spezifisch markieren. Nach Elimination der durch Methylierung abdissoziierbaren nukleären Proteine, dienen die nunmehr "freien" Phosphatvalenzen dem basischen Farbstoff als elektrostatische Haftpunkte. Die Anlagerung der Acridinorangemoleküle läßt sich anhand ihrer Fluoreszenzemission zahlenmäßig erfassen. Das Ausmaß anfärbbarer sog. "freier" PO_4 -Gruppen erlaubt Rückschlüsse auf Struktur- und Funktionszustand des DNA-Proteinkomplexes (RIGLER 1966).

So führte die Stimulation humaner Lymphozyten mit Phytohaemagglutinin in vitro zur Aktivierung der RNA-Biosynthese mit gleichzeitiger Erhöhung der Farbstoffbindungs-

kapazität des DNP-Komplexes für Acridinorange (DARZYN-KIEWICZ und Mitarbeiter 1969).

In Übereinstimmung mit der von HEIMER (1972) an postmortalen humanen Leberpunktaten vorgenommenen Untersuchungen konnten wir an Leberzellkernen von Meerschweinchen unterschiedlicher Altersklassen mit Acridinorange eine deutliche, altersabhängige Abnahme der Farbstoffbindungs-kapazität beobachten. Dies könnte für eine Blockade der DNA-PO₄-Gruppen sprechen.

Die enge räumliche Beziehung zwischen der DNA und den basischen Kernproteinen erlaubt die Vorstellung, daß die verminderte Farbstoffbindungs-kapazität des Chromatins älterer Individuen auf einer Einwirkung nukleärer Eiweiß-körper beruht. Prädestiniert hierfür erscheinen die im Nukleoprotein überwiegend basischen Proteine. Unter diesen fallen besonders die sog. argininreichen Histone in ihrer Eigenschaft auf, spezifische Bindungen mit der DNA einzugehen. In vitro zeigte diese Histonfraktion einen ausgeprägten - im Vergleich zu den anderen basischen Proteinen herausragenden - Hemmeffekt auf die RNA-Synthese matrisenwirksamer DNA (ALLFREY und Mitarbeiter 1963). Aufgrund dieser Spezifität erscheint es denkbar, daß die Blockierung der DNA-PO₄-Gruppen für die Acridinorangeanlagerung über die Guanidinogruppen der Histon-argininresiduen erfolgt (ALLFREY und Mitarbeiter 1963, DOUGLAS und FAMBROUGH 1969, FREDERIQ 1971).

Diese Hypothese findet eine experimentelle Bestätigung durch die Befunde von v.HAHN (1964/65 b). Gegenüber reinen Histonen weisen danach, aus Rinderthymus isolierte, nicht dissoziablen DNA-Histonaggregate eine auffallende Verminderung des - mit der Sakaguchireaktion photometrisch erfaßbaren - Arginins auf.

An Polypeptide gebundenes Arginin läßt sich auf empfindliche Weise mit der von MAGUN und KELLY (1969) beschriebenen Phenanthrenchinonfärbung fluoreszenzphotometrisch qualitativ und quantitativ nachweisen. Die Empfindlichkeit dieser Methode ist wesentlich höher als die der Sakaguchireaktion. Phenanthrenchinon verbindet sich mit den Guanidinogruppen des Arginins zu 2-Amino-1H-phenanthro (1, 10-d) -Imidazol (YAMADA und ITANO 1966). Bei den von uns nach dieser Methode angefärbten Leberzellkernen dienten die Guanidinogruppen argininreicher Histone dem Farbstoff als Reaktionspartner.

Als Ergebnis fand sich - analog zu den Beobachtungen mit der Acridinorangefärbung - eine eindeutige, alterskorrelierende Abnahme der Farbstoffbindungskapazität für Phenanthrenchinon.

Diese quantitative Verminderung zytophotometrisch darstellbarer Argininresiduen bei Tieren höheren Lebensalters könnte folgende Ursachen haben:

- a. Verminderung des Gesamthistongehaltes mit zunehmendem Alter der Tiere.
- b. Interfraktionelle Verschiebung der Histone.

c. Vermehrte, altersbedingte Fixation von Nukleoproteinen über Argininseitenketten an den DNA-Strang.

Eine Altersabhängige Verminderung des Gesamthistongehaltes - mit entsprechender Abnahme argininreicher Fraktionen - läßt sich nach Untersuchungen von v.HAHN (1964/65 a), LÖHR und HIMMELSBACH (1973 a, b) und LÖHR (1974) ausschließen. Ebenso scheint das Verhältnis DNA : Histon keine Altersschwankungen aufzuweisen (DINGMAN und SPORN 1969).

Die Möglichkeit einer dem Alter parallel gehenden, interfraktionellen Verschiebung der Histone - mit Verminderung argininreicher Eiweißkörper - kann mit der von uns gewählten Methode nicht ausgeschlossen werden.

Gestützt auf den bisher bekannten, altersbedingten Strukturwandel des Nukleohistons, könnten unsere Ergebnisse als Resultat einer im Alter zunehmenden stabilen DNA-Histonbindung interpretiert werden. Die in der DNA-Proteinbindung fixierten Guanidinogruppen wären demnach am Farbbindungsprozeß gehindert, woraus die Abnahme der Farbstoffbindungskapazität folgen würde. Die analoge Reduzierung des Farbstoffbindungsvermögens des Chromatins für Acridinorange könnte darauf hindeuten, daß die Proteinlagerung über die DNA-Phosphatbrücken folgt.

Ein spezifischer Effekt der Histone an der DNA ist die Ausbildung definierter Superhelices des Polynukleotid-

stranges (PARDON und Mitarbeiter 1967, JOHNS und FORRESTER 1969). Da für die Transsscription genetischer Information eine lokale Aufknäuelung des Doppelhelix Voraussetzung ist (BULANKIN und PARINA 1960, SAMIS und Mitarbeiter 1964, SCHAIBERGER und Mitarbeiter 1965), muß eine verstärkte Histonanlagerung mit Ausbildung "stabiler", nicht lösbarer Tertiär- und Quartärstrukturen zu einer funktionellen Ausschaltung, d.h. zu einer Blockade des zur Proteinbiosynthese nötigen Transsscriptionsmechanismus führen. Der Nachweis einer allgemeinen Reduktion der Proteinbiosynthese in der Leber alter Ratten (BULANKIN und Mitarbeiter 1964) scheint diese Hypothese zu bestätigen.

Nach allem deuten unsere Befunde darauf hin, daß der Anteil an die DNA fester gebundener Histone mit steigendem Alter zunimmt. Dies könnte Folge oder Ursache jener altersbedingten Umstrukturierung am Chromatin darstellen, welche sich in einer irreversiblen Verminderung der spezifischen Zelleistung dokumentiert. So wäre vielleicht ein Baustein geliefert für die Erklärung der Anpassungsschwäche des alternden Organismus an innere und äußere Belastungen.

Zusammenfassung:

Mit der Acridinorange- und Phenanthrenchinonfärbung wurden altersabhängige Veränderungen am DNA-Nukleoprotein-komplex von Meerschweinchenleberzellkernen fluoreszenz-photometrisch untersucht.

Mittels der Acridinorangefärbung lassen sich - nach vorheriger Acetylierung - sog. "freie" DNA-PO₄-Gruppen fluoreszenzzytometrisch quantitativ erfassen. Daneben gelingt mit dem Farbstoff Phenanthrenchinon die Fluoreszenzmarkierung nukleärer Arginin-Guanidinogruppen als Bestandteil basischer Kernproteine.

In der vorliegenden Arbeit wurden von insgesamt 35 weiblichen Meerschweinchen unterschiedlicher Altersklassen Leberausstrichpräparate gewonnen und mit den beiden Farbstoffen angefärbt. Auf fünf Färbeserien verteilt wurde die Fluoreszenzemission für Acridinorange (nach Acetylierung, pH 4.1) bei 530 nm und für Phenanthrenchinon bei 490 nm an jeweils 120 Zellkernen gemessen. Die Auswertung der Meßergebnisse ergab für beide Färbungen einen kontinuierlichen Abfall der Fluoreszenzemission mit steigendem Individualalter der Tiere.

Die verminderte Anfärbbarkeit der DNA-PO₄-Valenzen kann Folge einer Verbindung dieser Gruppen mit nukleären Proteinen sein.

Die analoge Abnahme der Farbstoffbindungskapazität von Argininresiduen im Zellkern für Phenanthrenchinon wird als Ergebnis einer Fusion von Arginin-Guanidinogruppen mit den Phosphatvalenzen des DNA-Moleküls diskutiert. Entsprechend den in der Literatur bekannten Befunden deuten unsere Ergebnisse auf eine zunehmende Funktions-einschränkung des Chromatins mit dem Alter.

Literatur:

1. AKINRIMISI, E.O., J. BONNER, P.O. Ts'O: Binding of basic proteins to DNA.
J.Molec.Biol. 11: 128 - 136 (1965)
2. ALLFREY, V.G., V.C. LITTAU and A.E. MIRSKY: On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus.
Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 49 (1963) 414 - 421
3. BENEKE, G., W. SCHMITT und K. PAULINI: Altersabhängige Veränderungen des Zellkerns in Beziehung zur Zelleistung.
In: Molekuläre und zelluläre Aspekte des Alterns.
hrsg.v. D. PLATT und H.H. LASCH
Stuttgart - New York (1971) 109 - 123
4. BILLEN, D. and S. HNILICAS: Inhibition of DNA Synthesis by histones.
In: The Nukleohistones.
hrsg.v. J. BONNER and P.O. Ts'O
San Francisco (1964) 289 - 297
5. BLOCH, D.P.: On the derivation of histone specificity.
Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 48: (1962) 321 - 326
6. BLUMENTHAL, H.T. and W. BERNIS: Autoimmunity and aging.
In: Advances in Geriontical Research.
(Bd.1), hrsg.v. B.L. STREHLER
New York (1964) 289 - 342
7. BÖHM, N. and E. SPRENGER: Fluorescence cytophotometry: a valuable method for the quantitative determination of nuclear Feulgen-DNA.
Histochemie 16 (1968) 100 - 118
8. BONNER, J.: The role of histones in the regulation of RNA-synthesis.
In: Regulation of nucleic acid and protein synthesis.
hrsg.v. V.V. KÖNIGSBERGER und L. BOSCH
Amsterdam - London - New York (1967) 211 - 224

9. BONNER, J. and P.O. TS'O: Histone biology and chemistry.
Science 141 (1963) 651 - 654
10. BÜRGER, M.: The physiological and nosological significance of biomorphosis.
Med.Mschr. 50 (1959) 2424 - 2432
11. BULANKIN, I.M. and E.V. PARINA: The protein synthesis changes in relation to the age of the organism.
Trans.Sci.res.Inst. 29 (1960) 7 - 22
12. BULANKIN, I.M., E.V. PARINA and N.I. GOLOVKO: Changes with age in proteinsynthesis. Synthesis of proteins in sections of liver of animals of different ages.
Excerpta med. (Amst.) Sect. XX (1964) No. 1358
13. BUTLER, J.A.V.: Role of histones and other proteins in gene controll.
Nature (Lond.) 207 (1965) 1041 - 1042
14. COMFORT, A.: Physiology, homeostasis and aging.
Gerontologia (Basel) 14 (1968) 224 - 234
15. CROWLEY, C. and H.J. CURTIS: The development of somatic mutations in mice with age.
Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 49 (1963) 626 - 628
16. CRUFT, H.J.: The fractions of histones on Sephadex G-75.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 54 (1961) 622 - 613
17. CURTIS, H.J. and J. TILLEY: Chromosome aberations in liver forced to regenerate by chemical or surgical methods.
J.Geront. 23 (1968) 140 - 141
18. CURTIS, H., J. TILLEY and C. CROWLEY: The role of genetic factors in the aging process.
J.Geront. 21 (1966) 365 - 368
19. CURTIS, H.J.: Cellular processes involving in aging.
Fed.Proc. 23 (1964) 662 - 667

20. CURTIS, H.J. and K.W. GEBHARD: Radiation induced aging in mice.
In: Proc. 2nd. Intern. Conf. on peaceful uses of Atomic Energy, Bd. 22, Geneve (1958) 53 - 57
21. DARZYNKIEWICZ, Z., L. BOLUND and N.R. RINGERTZ: Actinomycin binding of normal and phyto-hemagglutinin stimulated lymphocytes.
Exp. Cell. Re. 55 (1969) 120 - 132
22. DENKHAUS, W.: Kerngröße, DNS-Gehalt und Ploidieklassen menschlicher Leberzellen in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Zeitschrift für Gerontologie 3 (1970) 88 - 96
23. DENKHAUS, W. und D. HEIMER: Mikrofluorometrische Bestimmung der "freien" DNS-PO₄-Gruppen im Chromatin nativer Leberzellkerne von jungen und alten Meerschweinchen.
Gerontologia (Basel) 16 (1970) 1 - 13
24. DENKHAUS, W., G. KIEFER und P. MEUTER: Untersuchungen über altersabhängige Veränderungen der Säurelabilität des Nucleoproteids.
Virchows Arch.path.Anat. 3 (1969) 171 - 180
25. DINGMAN, C.W. and M.B. SPORN: Studies on chromatin. I. Isolation and characterisation of nuclear complexes of desoxiribonucleic acid, and protein from embryonic and adult tissues of the chicken.
J.biol.Chem. 239 (1969) 3483 - 3492
26. DOUGLAS, M. and Jr. FAMBROUGH: Nuclear protein fractions.
In: Handbook of Molekular Cytology. hrsg.v. A. LIMA, Amsterdam - London (1969) 460 - 468
27. ENESCO, H.E.: A cytophotometric analysis of DNA content of rat nuclei in aging.
J.Geront. 22 (1967) 445 - 448
28. FAILLA, A.: The aging process and somatic mutations.
In: The biologie of Aging. hrsg.v. B.L. STREHLER, Washington (1960) 170 - 175

29. FALZONE, J.A., Ch.H. BARROWS and N.W. SCHOCK: Age and polyploidy of rats liver nuclei as measured by volume and DNA-content.
J.Geront. 14 (1959) 2 - 8
30. FREDERIQ, E.: The chemical and physical properties of nucleohistones.
In: Histones and Nucleohistones.
hrsg.v. D.M.P. PHILIPPS, London - New York (1971) 136 - 178
31. FRENSTER, J.H.: Nuclearpolyanions als de-repressor of synthesis of nucleic acid.
Nature (London) 206 (1965 a) 680 - 683
32. FRENSTER, J.H.: A modell of specific de-repression within interphase chromatin.
Nature (London) 206 (1965 b) 1209 - 1270
33. FRENSTER, J.H., V.G. ALLFREY and G. MIRSKY: Repressed and active chromatin from interphase lymphocytes.
Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 50 (1963) 1026 - 1032
34. GURDON, J.B. and R.A. LASKY: The transplantation of nuclei from single cultured cells into enucleate frog's eggs.
J.Embryol.exp.Morph. 24 (1970) 227 - 248
35. GURDON, J.B. and B. UEHLINGER: "Fertile" intestine nuclei.
Nature (Lond.) 210 (1966) 1240 - 1241
36. HABERS, E. und W. SANDRITTER: Aufbau und Funktion des Chromatins.
Klin.Wschr. 51 (1973) 631 - 643
37. HABERS, E.: Einführung in die Molekularbiologie. Nucleinsäuren, Biochemie und Funktion. Stuttgart (1969)
38. HABERS, E. und W. SANDRITTER: Gesteigerte Heterochromatinisierung als pathogenetisches Prinzip.
Dtsch.med.Wschr. 93 (1968) 269 - 271
39. HABERS, E., B. LEDERER, W. SANDRITTER und U. SPAAR: Untersuchungen an Histonen. IV "Heterochromatinisierung" in der Rattenleber während der Carzinogenese.
Virchows Arch.path.Anat. 1 (1968) 98 - 106

40. HAHN, H.P.von: Altern von Nucleoproteinen.
In: Molekulare und zelluläre Aspekte des Alterns.
hrsg.v. D. PLATT und H.G. LASCH, Stuttgart - New York (1971) 125 - 127
41. HAHN, H.P.von und E. FRITZ: Age-related alterations in the structure of rat liver DNA related to age, histone content and ionic strength.
Gerontologia 12 (1966) 237 - 250
42. HAHN, H.P.von: Stabilisation of DNA structure by histones against thermal denaturation.
Experienta (Basel) 21 (1965) 90 - 91
43. HAHN, H.P.von: Age-Related Alteration in the Structure of DNA. II. The Role of Histones.
Gerontologia (Basel) 10 (1964/65 a) 174 - 182
44. HAHN, H.P.von: Analysis of Histones from Thymus of Young and Old Bovines by Gel Filtration.
Gerontologia (Basel) 10 (1964/65 b) 107 - 116
45. HAHN, H.P.von: The role of DNA in the Aging process.
Gerontologia (Basel) 8 (1963) 168 - 178
46. HAHN, H.P.von and F. VERZAR: Age dependet thermal denaturation of DNA from bovine thymus.
Gerontologia (Basel) 7 (1963) 104 - 107
47. HEIMER, D.: Quantitative Bestimmung der "freien" DNS-PO₄-Gruppen in menschlichen Leberzellkernen in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Diss. Mainz (1972)
48. HOLLANDER, J. and O.H. BARROWS: Biochemical studies of aged rondet brains.
Gerontologia (Basel) 6 (1966) 23 - 28
49. HOLGER, P. and H.P.von HAHN: A modell of "regulatory" aging of the cell at the gene level.
J.Geront. 21 (1966) 237 - 250
50. HUANG, R.C.: Decoding of genetic information in higher systems.
Proc. 8th. Int. Congr. Geront., Washington (1969) 131 - 133

51. HUANG, R.C., J. BONNER and K. MURRAY: Physical and biological properties of soluble nucleohistones.
J.molec.Biol. 8 (1964) 54 - 64
52. HUANG, R.C. and J. BONNER: Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis.
Proc.Nat.Sci. (Wash.) 48 (1962) 1216-1222
53. JACOB, F. and J. MONOD: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins.
J.molec.Biol. 3 (1961) 318 - 356
54. JOHNS, E.W. and J. FORRESTER: Studies on nuclear proteins. The binding of extra acidic proteins to dextoxyribonucleoprotein during the preparation of nuclear proteins.
J.Biochem. (Tokyo) 8 (1969) 547 - 551
55. KURNICK, N.B.: The effect of aging DNA system on body and organ weight and cellular content.
J.Geront. 17 (1962) 245 - 253
56. LÖHR, J. und K.H. HIMMELSBACH: Fluoreszenzzytometrische Untersuchungen zum Alterungsprozeß an Mäuseleberzellkernen.
Zeitschrift für Gerontologie 2 (1973 a) 131 - 143
57. LÖHR, J. und K.H. HIMMELSBACH: Der Alterungsprozeß und seine Beziehung zur Zelleistung.
Kongreß für deutsche Gerontologie in Nürnberg (1973 b)
58. LÖHR, J.: Zytometrische Beobachtungen über den Strukturwandel und die hormonelle Stimulierbarkeit des Nukleoproteid nativer Leberzellkerne von Mäusen und Ratten in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Aktuelle Gerontologie (1974): im Druck
59. MAGUN, B.E. and J.W. KELLY: A new fluorescent method with phenanthrenquinone for the histochemical demonstration of arginine residues in tissues.
J.Histochem.Cytochem. 17 (1969) 821 - 827
60. NIERENBERG, M.W. and J.H. MATTAEI: The dependence of cellfree protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polynucleotides.
Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 47 (1961) 1588 - 1602

61. PARDON, J.F., M.H.F. WILKINS and B.M. RICHARDS:
Superhelical modell for nucleohistone.
Nature (Lond.) 215 (1967) 508 - 509
62. RIGLER, R., Jr.: Mikrofluorometric characterisation
of intracellular nucleid acid and nucleo-
proteins by acridinorange.
Acta Physiol.Scand. Vol. 67, Suppl. 267
(1967) 1 - 123
63. RIS, H.: Ultrastructure of the animal chromosome.
In: Regulation of nucleic acid and pro-
tein biosynthesis.
hrsg.v. V.V. KÖNIGSBERGER and L. BOSCH,
Amsterdam (1967) 11 - 21
64. SAMIS, H.V., V.J. WULF₃ and J.A. FALZONE: The incorpo-
ration of H³-cytidine into RNA of liver
nuclei of young and old rats.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 91 (1964)
223 - 232
65. SANDRITTER, W., G. KIEFER, G. SCHLÜTER und W. MOORE:
Eine cytophotometrische Methode zur Ob-
jektivierung der Morphologie von Zell-
kernen.
Ein Beitrag zum Problem von Eu- und Hete-
rochromatin.
Histochemie 10 (1970) 341 - 352
66. SCHAIBERGER, G.E., B. SALLMAN and J.L. GIEGEL:
A metabolic study of aging in the bacte-
rial cell.
J.Geront. 20 (1965) 23 - 28
67. SETLOW, R.B.: Repair of DNA.
In: Regulation of nucleic acid and protein
biosynthesis.
hrsg.v. V.V. KÖNIGSBERGER and L. BOSCH,
Amsterdam - London (1967) 51 - 61
68. SZILARD, L.: On the nature of the aging process.
Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 45 (1959)
30 - 45
69. VENDRELY, R. and C. VENDRELY: Arginin and desoxyri-
bonucleic acid content of erythrocyte
nuclei and sperms of some species of
fishes.
Nature (Lond.) 172 (1953) 30 - 31

70. VERZAR, F.: Primäres Altern von Makromolekülen.
Aktuelle Gerontologie, Bd. 1, Heft 9,
Sonderdruck, Stuttgart (1971)
71. WALFORD, R.L.: Autoimmunity and aging.
J.Geront. 17 (1962) 281 - 285
72. WATSON, J.D. and F.H.C. CRICK: A structure for
desoxyribose nucleic acid.
Nature (Lond.) 171 (1953) 737 - 738
73. YAMADA, S. and H. ITANO: Phenanthrenequinone as an
analytical reagent for argine and other
monosubstituted guanidines.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 130 (1966)
538 - 544

Lebenslauf:

Ich, Klaus Döderlein, wurde am 17. Oktober 1946 in Kaiserslautern als erster Sohn des Facharztes Dr. Dieter Döderlein und seiner Ehefrau Gertrud, geborene Haffner, geboren.

Die ersten fünf Jahre verbrachte ich in meiner Geburtsstadt. Im Jahre 1951 wechselten meine Eltern ihren Wohnsitz nach Annweiler am Trifels, wo sich mein Vater als Facharzt für Hals-Nasen-Ohrenleiden niederließ. Dort besuchte ich von 1952 an für vier Jahre die Volksschule. Meine Schulbildung setzte ich im Jahre 1956 am altsprachlichen Gymnasium in Landau/Pfalz fort. Nach der Sexta, im Jahre 1957, besuchte ich das Jesuiteninternat St. Blasien im Schwarzwald, dem ein altsprachlicher Schulzweig angegliedert ist, wo ich 1963 die mittlere Reife bestand. Am Neusprachlichen Gymnasium in Landau/Pfalz setzte ich meine Schulausbildung fort. Meine Eltern hatten inzwischen ihren Wohnsitz nach Landau verlegt. Am 24. Oktober 1966 bestand ich die Reifeprüfung und entschloß mich für das Medizinstudium. Im November 1966 konnte ich mich an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz für das Fach Medizin immatrikulieren. Im Sommersemester 1968 bestand ich die naturwissenschaftliche, im Wintersemester 1969/70 die ärztliche Vorprüfung. Das klinische Studium setzte ich an den Universitätskliniken Mainz fort und legte dort am 26. Juni 1973 das Staatsexamen ab.

